

REF 41425 	ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM		Distribuído por: 
INSTRUÇÕES PARA A UTILIZAÇÃO		  100	

APLICAÇÃO

O teste *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* é um teste imunológico quimioluminescente (CLIA) para a determinação quantitativa, com instrumentação dedicada, *Analizador ZENIT RA*, dos anticorpos específicos de classe IgM dirigidos contra a cardiolipina em amostras de soro ou de plasma humano (EDTA, Heparina). Este ensaio é utilizado como técnica de diagnóstico suplementar na avaliação da síndrome de antifosfolípidos (APS).

ATENÇÃO: Qualquer decisão médica não poderá basear-se unicamente no resultado deste teste, mas deverá incluir o conjunto de todos os dados clínicos e laboratoriais disponíveis.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A presença de anticorpos antifosfolípidos (aPL) em doentes com trombozes venosas e/ou arteriais, ou em doentes com complicações obstétricas, é o marcador de laboratório essencial (em conjunto com o LAC) para o diagnóstico da “*síndrome de anticorpos antifosfolípidos (APS)*”¹.

Segundo os critérios de Sapporo, actualizados em 2006¹, o diagnóstico de APS pode ser definido na presença de pelo menos um critério clínico e um laboratorial.

Os critérios laboratoriais prevêem a positividade persistente no tempo (12 semanas) a um título médio/alto de anticorpos anti-cardiolipina (aCL) e/ou anticorpos anti- β 2-Glicoproteína I (a- β 2GPI) e/ou anticorpos “lupus anticoagulant” (LAC).

Os anticorpos aCL e a- β 2GPI podem ser de isotipo G ou M e ter um título superior a 40 U/mL.

A presença de anticorpos antifosfolípidos foi demonstrada pela primeira vez em 1941 em amostras de doentes com diagnóstico serológico de sífilis². Foi evidenciado que o soro destes doentes interactuava com o fosfolípido cardiolipina, contido nas camadas de coração bovino do teste VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) considerado específico para o diagnóstico da sífilis.

A especificidade do ensaio VDRL foi posta em discussão pelos numerosos resultados de falsa positividade em amostras de doentes com doenças auto-imunes sistémicas e em ausência de doenças venéreas. Em 1983, Harris et al.³, utilizando um método de elevada sensibilidade para a determinação dos anticorpos anti-cardiolipina, encontraram em 61% dos doentes com LES, concentrações elevadas de aCL, demonstrando uma correlação significativa entre níveis de anticorpos e as trombozes venosas e arteriais, o “lupus anticoagulant” e a trombocitopenia.

Em 1990, dois grupos independentes de pesquisadores ^{4,5} demonstraram que, para evidenciar os anticorpos anti-cardiolipina, é indispensável a presença da β 2-Glicoproteína I.

A β 2-Glicoproteína I tem um peso molecular de aproximadamente 50kDa, uma concentração plasmática de aproximadamente 0,15 a 0,30mg/mL e uma função biológica ainda hoje obscura (parece capaz de modular o metabolismo das lipoproteínas, de interferir em algumas reacções coagulativas e ter um efeito antiagregante das plaquetas⁶⁻⁹). Estudos cristalográficos recentes definiram a estrutura tridimensional da proteína e a sua organização em 5 domínios ¹⁰⁻¹¹, dando informações úteis sobre o funcionamento desta molécula.

Em especial, o V domínio apresenta numerosos resíduos de lisina que são responsáveis pela interacção electrostática da β 2-Glicoproteína I com os fosfolípidos aniónicos das membranas celulares¹². Com o mesmo mecanismo dá-se a ligação *in vitro* entre a β 2-Glicoproteína e a cardiolipina adsorvida na fase sólida. Foi amplamente demonstrado que os anticorpos anti-cardiolipina de doentes com síndrome de anticorpos antifosfolípidos reconhecem uma porção modificada da β 2-Glicoproteína I; esses auto-anticorpos não são capazes de reconhecer a cardiolipina, a β 2-Glicoproteína nativa não ligada a fases sólidas ou a outras estruturas ^{4,5,13-15}.

Os conhecimentos adquiridos até hoje permitem-nos definir os anticorpos anti-cardiolipina como anticorpos capazes de ligar-se a neoepítopes gerados pela ligação entre a β 2-Glicoproteína e a cardiolipina adsorvida numa fase sólida.

Posteriormente, foi demonstrado ^{4,16} que os anticorpos anticardiolipina nos doentes com doenças auto-imunes podem reconhecer a β 2-Glicoproteína I directamente adsorvida em microplacas de polistireno, tratado com UV ou irradiado. Também neste caso, o reconhecimento da molécula pelos auto-anticorpos é determinado pelas modificações estruturais provocadas pela ligação da proteína à fase sólida.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* para a determinação quantitativa dos anticorpos IgM específicos anti-cardiolipina, dependentes da β 2-Glicoproteína I, utiliza um método imunológico indirecto, em dois passos, baseado no princípio da quimioluminescência.

O composto cardiolipina- β 2-Glicoproteína I é utilizado para revestir as partículas magnéticas (fase sólida) e um anticorpo anti-IgM humano é marcado com um derivado do éster de acridina (conjugado).

Durante a primeira incubação, os anticorpos específicos presentes na amostra, nos calibradores ou nos controlos, ligam-se à fase sólida.

Durante a segunda incubação, o conjugado reage com os anticorpos anti-cardiolipina IgM capturados pela fase sólida.

Depois de cada incubação, o material não aderido à fase sólida é removido por aspiração e subsequente lavagem.

A quantidade de conjugado marcado que ficou aderido à fase sólida é avaliada através da reacção de quimioluminescência e da medição do sinal luminoso. O sinal gerado, expresso em unidades relativas de luz (RLU, Relative Light Unit), é indicativo da concentração de anticorpos específicos presentes na amostra, nos calibradores e nos controlos.

AUTOMATIZAÇÃO

O *Analizador ZENIT RA* executa automaticamente todas as operações previstas pelo protocolo do ensaio: adição na cuvete de reacção, as amostras, calibradores, controlos, partículas magnéticas, conjugado e soluções de activação de quimioluminescência; separação magnética e lavagem das partículas; medição da luz emitida.

O sistema calcula os resultados do ensaio para as amostras e para os controlos através da curva de calibração memorizada e imprime um relatório que inclui todas as informações relativas ao ensaio e ao doente.

MATERIAIS E REAGENTES

Materials e reagentes fornecidos

REAG	1	MP	2,5 mL
------	---	----	--------

Partículas magnéticas revestidas com composto cardioplipina- β 2-Glicoproteína I em tampão fosfato com proteínas estabilizantes, tensoactivo, Pro-Clin 300 e azida de sódio (< 0,1%) como conservantes.

REAG	2	CONJ	25 mL
------	---	------	-------

Anticorpo monoclonal de rato anti-IgM humana marcado com um derivado do éster de acridina (conjugado), em tampão fosfato com proteínas estabilizantes e azida de sódio (< 0,1%) como conservante.

REAG	3	DIL	25 mL
------	---	-----	-------

Solução Diluente de Amostra: tampão fosfato com seroalbumina bovina, tensoactivo, corante amarelo, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ como conservantes.

REAG	4	CAL A	1,6 mL
------	---	-------	--------

Soro humano com baixa concentração de anticorpos anti-cardiolipina IgM em tampão fosfato com seroalbumina bovina, tensoactivo, corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ como conservantes.

REAG	5	CAL B	1,6 mL
------	---	-------	--------

Soro humano com alta concentração de anticorpos anti-cardiolipina IgM em tampão fosfato com seroalbumina bovina, tensioactivo, corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ como conservantes.

Todos os reagentes estão prontos a usar.

Os reagentes 1, 2 e 3 são embalados em conjunto constituindo um cartucho de reagentes.

As concentrações dos calibradores são indicadas em MPL U/mL (Unidades MPL) e calibradas contra os soros de referência "Harris". Os valores das concentrações são específicos para cada lote de produto e estão registados no DATA DISK incluído no kit.

DATA DISK

Mini-DVD que contém as informações relativas a todos os produtos da Linha ZENIT RA (Reagentes, Calibradores, Soros de controlo) actualizados até ao último lote de produção à excepção dos produtos expirados na data de realização de cada DATA DISK novo.

Basta conservar o DATA DISK com o número de lote mais elevado para manter actualizadas as informações necessárias para o funcionamento correcto do sistema.

Materiais e reagentes necessários mas não fornecidos no kit

- ZENIT RA Analyzer Cód. nº 41400
- ZENIT RA Cuvette Cube * Cód. nº 41402
Embalagem de 960 cuvetes.
- ZENIT RA System Liquid * Cód. nº 41409
1 garrafa de 0,5 litros de solução 10x.
- ZENIT RA Wash Solution * Cód. nº 41407
1 garrafa de 0,5 litros de solução 20x.
- ZENIT RA Trigger Set * Cód. nº 41403
1 frasco de 250 mL de Trigger A (solução de pré-activação)
1 frasco de 250 mL de Trigger B (solução de pré-activação)
- ZENIT RA D-SORB Solution Cód. nº 41436
Embalagem de 2 garrafas de 1 litro de solução pronta a usar.
- ZENIT RA Cartridge Checking System * Cód. nº 41401

- ZENIT RA Top Cap Set Cód. nº 41566
300 tampas externas para tapar os tubos dos calibradores após a primeira utilização.

(*) O analisador ZENIT RA e os acessórios identificados pelo asterisco são fabricados por Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Liège, Bélgica e distribuídos por A. Menarini Diagnostics Srl.

Outros Reagentes Aconselhados

ZENIT RA APS IgM CONTROL SET Cód. nº 41454
3 tubos de 1,5 mL de soro humano negativo e 3 tubos de 1,5 mL de soro humano positivo para anticorpos anti-cardiolipina.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Os reagentes fornecidos no kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* são exclusivamente para uso em diagnóstico *in vitro* e não para uso *in vivo* em pessoas ou animais.

Este produto deve ser usado por utilizadores profissionais respeitando rigorosamente as instruções deste documento.

A Menarini não pode ser considerada responsável por perdas ou danos provocados por uma utilização diferente da indicada nas instruções fornecidas.

Precauções de segurança

Este produto contém material de origem animal e, portanto, deve ser manuseado como potenciais agentes infecciosos.

Este produto contém componentes de origem humana. Todas as unidades de soro, ou plasma, utilizadas para o fabrico dos componentes deste Kit, foram analisadas com métodos aprovados pela FDA e resultaram não reactivas para HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 e anti-HIV2.

Todavia, como nenhum método de análise é capaz de garantir a ausência de agentes patogénicos, todo o material de origem humana deve ser considerado potencialmente infeccioso e manuseado como tal.

Se a embalagem estiver estragada, com derramamento dos reagentes, descontaminar a área afectada com uma solução diluída de Hipoclorito de Sódio utilizando dispositivos de protecção individual adequados (bata, luvas, óculos).

Eliminar o material utilizado e os resíduos da embalagem afectada pelo derramamento, de acordo com as normas nacionais para a eliminação de lixos potencialmente infecciosos.

Alguns reagentes contêm azida de sódio como conservante. Como a azida de sódio pode reagir com o chumbo, cobre e latão revestido de chumbo, formando azidas explosivas nos canos, aconselha-se a não deitar reagentes ou resíduos no esgoto mas respeitar as normas nacionais em matéria de eliminação de lixos potencialmente perigosos.

Precauções de utilização

Para assegurar a obtenção de resultados válidos devem ser rigorosamente respeitadas estas instruções de utilização e as indicações do manual de operação do instrumento.

Os reagentes fornecidos no kit devem ser utilizados exclusivamente com o sistema *ZENIT RA Analyzer*.

Os componentes do cartucho de reagentes não podem ser retirados do cartucho e reagrupados novamente.

Não usar o kit para além do prazo de validade.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Os reagentes fornecidos no kit estão todos prontos a usar.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Conservar os reagentes fornecidos no kit entre 2 e 8°C em posição vertical e às escuras.

Nestas condições, o cartucho de reagente e os calibradores que não tiverem sido abertos estarão estáveis até ao fim do prazo de validade.

O cartucho de reagentes, depois de aberto, poderá ser utilizado por 60 dias, se conservado no frigorífico entre 2 e 8°C ou a bordo da máquina.

Os calibradores, depois de abertos, poderão ser utilizados por 60 dias, se conservados no frigorífico entre 2 e 8°C e se a permanência a bordo da máquina não ultrapassar as 6 horas por sessão.

Não congelar os reagentes e os calibradores.

PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

O ensaio deve ser executado em amostras humanas de soro e de plasma (EDTA - Heparina).

Desaconselha-se o uso de amostras lipémicas, hemolisadas e turvas.

Se o ensaio for executado mais de 8 horas depois da colheita das amostras, separar o soro do coágulo, ou o plasma dos glóbulos vermelhos transferir o sobrenadante do tubo primário para um tubo secundário seco.

Antes de serem analisadas, as amostras podem ser conservadas no frigorífico entre 2 e 8°C no máximo por 7 dias.

Se a dosagem for executada mais de 7 dias depois, conservar as amostras congeladas (< - 20°C).

Evitar congelamentos e descongelamentos repetidos.

PROCEDIMENTO

Para obter desempenhos analíticos válidos, respeitar escrupulosamente as instruções do manual de operação do instrumento.

Carregamento dos reagentes

Os reagentes fornecidos no kit estão todos prontos a usar.

Antes de inserir o cartucho de reagentes no sistema, o tubo das partículas magnéticas deve ser agitado por rotação horizontal de modo a facilitar a suspensão das partículas. Executar a operação evitando a formação de espuma.

Colocar o cartucho de reagentes na área dos reagentes do analisador, utilizando as indicações para o efeito e deixar em agitação durante pelo menos 30 minutos antes de usar.

A colocação do cartucho de reagentes determina simultaneamente a leitura do código de barras de identificação. Se o rótulo do cartucho estiver estragado ou que a leitura falte por qualquer outro motivo, os dados de identificação do cartucho de reagentes podem ser introduzidos manualmente.

O analisador mantém automaticamente as partículas magnéticas em agitação contínua.

Se o cartucho de reagentes for retirado do analisador, deve ser conservado na vertical e às escuras entre 2 e 8°C.

Carregamento dos calibradores e dos controlos

Os calibradores e os controlos ZENIT RA estão prontos a usar. Deixar os calibradores e os controlos à temperatura ambiente durante 10 minutos e agitar cuidadosamente, manualmente ou com um vortex, evitando a formação de espuma. Não inverter o tubo e não retirar a tampa perfuradora (tampa amarela para os calibradores e tampas verdes ou azuis para os controlos).

No caso em que os calibradores ou os controlos, sejam utilizados pela primeira vez, premir a tampa perfuradora para baixo até ao fim. Deste modo, a membrana que veda o tubo será perfurada tornando assim possível o acesso ao líquido contido no mesmo. Se a tampa perfuradora for utilizada correctamente, a risca vermelha que se encontra no topo do rótulo ficará coberta (Fig. 1 – Tubo selado e Tubo perfurado).

Os calibradores e/ou os controlos, já utilizados, deverão ser fechados com uma tampa externa branca de modo que a risca vermelha do rótulo fique coberta.

Só devem ser carregados no instrumento os tubos sem tampa externa (tampa branca) e com a risca vermelha do rótulo coberta (Fig. 1 – Tubo perfurado).

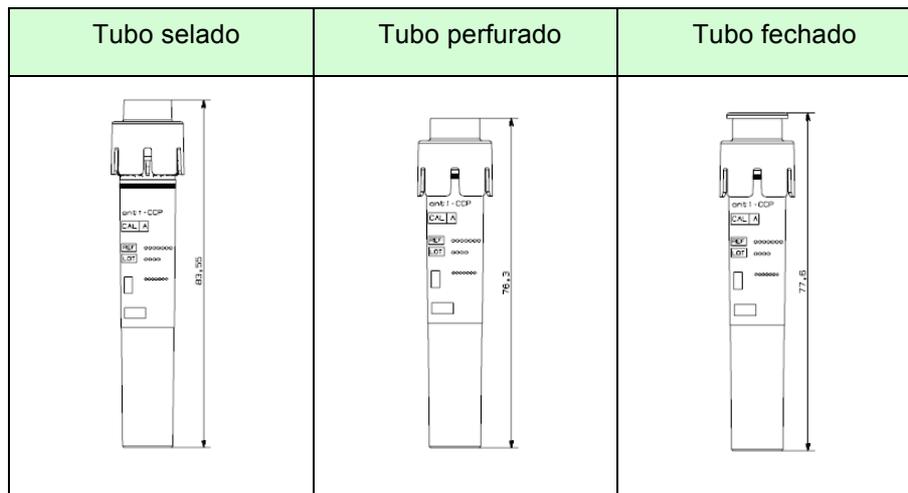
Introduzir no analisador os calibradores ou os controlos na área das amostras, depois da leitura do código de barras. Os dados do código de barras também podem ser introduzidos manualmente se o rótulo estiver estragado ou em caso de falha da leitura.

Os valores da concentração de anticorpos IgM anti-cardiolipina presente nos calibradores, ou nos controlos, estão registados no DATA DISK e são transferidos automaticamente para o analisador. Em caso de falha de transferência dos dados, é possível introduzi-los manualmente.

No final da sessão, os recipientes dos calibradores e dos controlos devem ser fechados com as respectivas tampas externas (tampas brancas) e conservados entre 2 e 8°C até serem novamente utilizados (Fig. 1 – Tubo fechado).

Os calibradores só podem ser utilizados ao máximo quatro vezes.

Figura 1: Desenho do tubo



Carregamento das amostras

Identificar as amostras utilizando o leitor de código de barras e introduzi-las no analisador, na área respectiva. Em caso de falta do código de barras na amostra ou em caso de falha de leitura, os dados de identificação da amostra podem ser introduzidos manualmente.

Seleccionar os parâmetros requeridos para cada amostra.

Calibração

O *Analisador ZENIT RA* utiliza uma curva de calibração memorizada (master curve), criada pelo fabricante para cada lote de cartuchos de reagentes.

Os parâmetros das “master curve”, juntamente com os valores das concentrações dos calibradores, estão memorizados no DATA DISK e são transferidos para a base de dados do analisador.

Os calibradores (A e B) são utilizados para recalibrar a “master curve” quer em função do analisador utilizado, quer dos reagentes a bordo.

Para executar a recalibração, analisar os dois calibradores (A e B) em triplicado e realizar uma réplica por cada controlo. Os valores de concentração obtidos com os controlos permitem validar a nova calibração.

Assim que a recalibração da “master curve” tiver sido aceite e memorizada, todas as amostras seguintes poderão ser analisadas sem outra calibração, excepto nos seguintes casos:

- quando estiver carregado a bordo do analisador um cartucho de reagentes com um lote novo;
- quando os valores dos controlos não estiverem dentro do intervalo de aceitabilidade;
- quando for executada a operação de manutenção do analisador;
- quando tiver expirado a validade da “master curve” recalibrada.

O prazo de validade da “master curve” recalibrada para o kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* é de 15 dias.

A gestão da recalibração é accionada automaticamente pelo analisador.

Ensaio

Premir o botão de início.

1. O sistema aspira 100 µL de Diluente de Amostra, 20 µL de Partículas Magnéticas, 100 µL de Diluente de Amostra e 6 µL de amostra, ou controlo para os calibradores, o soro positivo é fornecido pré-diluído com o Diluente de Amostra e o volume aspirado é de 106 µL). As soluções e a suspensão aspiradas são distribuídas na cuvete de reacção.
2. A cuvete de reacção é incubada no rotor a 37°C durante 10 minutos.
3. Depois desta fase de incubação, as partículas magnéticas são separadas e lavadas.
4. São distribuídos 200 µL de conjugado na cuvete.
5. A cuvete de reacção é incubada no rotor a 37°C durante 10 minutos.
6. Depois desta última fase de incubação, as partículas magnéticas são separadas e lavadas e a cuvete é transferida para a câmara de leitura.
7. A quantidade de conjugado aderido à fase sólida, expressa em RLU, é directamente proporcional à concentração de IgM anti-cardiolipina presente na amostra.
8. Os resultados obtidos são interpolados na curva de calibração e expressos em concentrações.

Se o valor de concentração de uma amostra exceder o limite superior do intervalo de medição a amostra deve ser diluída e testada novamente. O novo valor obtido é multiplicado pelo factor de diluição utilizado para obter o resultado final.

CONTROLO DE QUALIDADE

Para assegurar a validade do ensaio, devem ser testados soros de controlo com níveis diferentes de concentração (pelo menos um soro negativo e um soro positivo) cada dia em que se executa o ensaio.

De acordo com as práticas de qualidade de cada laboratório, para a verificação dos resultados do ensaio, podem ser realizados mais controlos, ou mais frequentemente. Siga os procedimentos de qualidade locais.

Se forem utilizados os soros de controlo ZENIT RA, os valores médios esperados e os limites de aceitabilidade são os indicados no DATA DISK, dados também presentes na embalagem dos controlos.

Se forem utilizados soros de controlo diferentes, é necessário, antes da sua utilização, definir os valores esperados com os reagentes e com o sistema ZENIT RA.

Se o valor dos controlos não estiver dentro do intervalo de aceitabilidade especificado, os respectivos resultados do ensaio são inválidos e essas amostras devem ser analisadas novamente.

Neste caso é necessário executar uma recalibração antes da repetição do ensaio.

CÁLCULO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Cálculo dos resultados

A concentração dos anticorpos IgM anti-cardiolipina presentes nas amostras em exame é calculada automaticamente pelo sistema. Os valores podem ser visualizados no ecrã ou impressos.

As concentrações são expressas em MPL U/mL.

O cálculo da concentração na amostra é efectuado através da leitura do resultado obtido para cada amostra numa curva de calibração elaborada com um sistema de “fitting” logístico de quatro parâmetros (4PL, Y ponderado), corrigida periodicamente em função dos resultados obtidos para os calibradores.

Para mais informações sobre o sistema de cálculo dos resultados, consultar o manual de instruções do sistema.

Interpretação dos resultados

O intervalo de medição do ensaio *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* é de: 0,0 a 300 MPL U/mL.

Os valores inferiores a 0,0 MPL U/mL são valores extrapolados e podem ser indicados como “iguais a 0,0 MPL U/mL”.

Os valores superiores a 300 MPL U/mL podem ser indicados como “superiores a 300 MPL U/mL”, ou a amostra deve ser testada novamente após diluição.

Os resultados das amostras podem ser interpretados do seguinte modo:

(MPL U/mL)	Interpretação
< 10	A amostra deve ser considerada Negativa pela presença de IgM anti-cardiolipina
≥ 10	A amostra deve ser considerada Positiva pela presença de IgM anti-cardiolipina

Os valores acima mencionados devem ser considerados como valores indicativos. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios intervalos de referência.

LIMITES DO ENSAIO

Para efeitos de diagnóstico, os resultados obtidos com o kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* e o sistema *ZENIT RA Analyzer* devem ser utilizados em conjunto com os outros dados clínicos e de laboratório à disposição do médico.

A contaminação bacteriana das amostras e a inactivação por calor podem influenciar o resultado do ensaio. Os anticorpos heterófilos presentes nas amostras de soro humano podem reagir com os reagentes à base de imunoglobulinas, provocando interferências nos ensaios imunológicos *in vitro*. Estas amostras podem dar lugar a valores anormais, se analisados com o kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM*.

VALORES PREVISTOS

Foram analisadas as amostras de 99 doadores seleccionados casualmente para verificar a presença de anticorpos IgM anti-cardiolipina.

Todas as amostras analisadas deram resultados negativos, com um valor médio de 1,3 MPL U/mL e um desvio padrão de 1,48 MPL U/mL.

Com os resultados obtidos foi calculado o "Limit of Blank" (LoB = o valor mais elevado que podemos esperar numa série de amostras que não contenham o analito). O "Limit of Blank", determinado como percentil 95 de população negativa, deu resultado igual a 4,3 MPL U/mL com o Lote de reagentes 2.

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

Foram testadas 344 amostras com o kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM*, das quais 68 amostras de doentes com a síndrome de anticorpos antifosfolípidos (APS), 46 amostras de doentes com doenças auto-imunes sistémicas reumáticas (7 conectivites, 15 lúpus eritematoso sistémico, 24 artrites reumatóides), 30 amostras de doentes com diversas patologias infecciosas (5 HIV, 7 HBV, 18 HCV), 100 amostras de indivíduos normais e 100 amostras de doadores.

Na população presumivelmente negativa (46 amostras de doentes com doenças auto-imunes sistémicas reumáticas, 30 amostras de pacientes com diversas patologias infecciosas, 100 amostras de indivíduos normais e 100 amostras de doadores) estudada, 7 amostras deram resultados positivos e 269 negativos.

- **Especificidade de diagnóstico: 97,5% (269/276)**

Na população presumivelmente positiva (68 amostras de doentes com a síndrome de anticorpos antifosfolípidos) estudada, 41 amostras deram resultados negativos e 27 positivos.

- **Sensibilidade de diagnóstico: 39,7% (27/68)**

Em função dos resultados da especificidade e da sensibilidade de diagnóstico, a **concordância de diagnóstico é de 86,0%** (296/344).

Das 68 amostras de doentes com a síndrome de anticorpos antifosfolípidos, 58 amostras deram resultados positivos com o kit ZENIT RA CARDIOLIPIN IgG (85,3%).

DESEMPENHO

Advertência: os dados apresentados não representam as especificações de funcionamento do kit, mas constituem a evidência experimental em como o kit funciona dentro dessas especificações no modo previsto pelo fabricante.

Precisão e Reprodutibilidade

A precisão e a reprodutibilidade do kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* foram avaliadas utilizando um protocolo baseado nas directrizes do documento EP5-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

A **precisão** foi calculada analisando os resultados de cinco soros com 20 repetições cada (um negativo e quatro positivos com diferentes concentrações de anti-cardiolipina IgM) executados com dois lotes de reagentes diferentes na mesma sessão experimental.

A concentração do soro anti-cardiolipina IgM negativo (N3) deu um resultado compreendido no intervalo de 0,0 a 0,0 MPL U/mL e de 0,0 a 0,0 MPL U/mL respectivamente com o Lote de reagentes 1 e 2.

Na Tabela estão indicados os resultados obtidos com os 4 soros positivos.

Amostra	Reagentes Lote nº	Concentração média (MPL U/mL)	SD	CV %
P1	1	22,2	1,16	5,2
	2	20,8	0,92	4,4
P2	1	47,8	2,50	5,2
	2	44,8	1,06	2,4
P3	1	88,3	5,94	6,7
	2	87,2	3,54	4,1
P4	1	182,2	7,83	4,3
	2	176,3	4,07	2,3

A **reprodutibilidade** foi calculada analisando os resultados da determinação de cinco soros (um negativo e quatro positivos com diferentes concentrações de anti-cardiolipina IgG) executada individualmente com dois lotes de reagentes diferentes, em 30 sessões diferentes.

A concentração do soro anti-cardiolipina IgM negativo (N3) deu um resultado compreendido no intervalo de 0,0 a 2,3 MPL U/mL.

Na Tabela estão indicados os resultados obtidos com os 4 soros positivos.

Amostra	Concentração média (MPL U/mL)	SD	CV %
P1	22,9	2,14	9,3
P2	54,6	4,15	7,6
P3	131,2	8,79	6,7
P4	162,2	14,68	9,1

Linearidade das Diluições

A precisão das diluições do kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* foi avaliada utilizando um protocolo baseado nas directrizes do documento EP6-A do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Foram doseadas diluições seriadas de 3 soros de concentração elevada de IgM anti-cardiolipina, diluições executadas com o Diluente de Amostra.

Os resultados deste estudo estão resumidos na tabela seguinte.

Amostra	Factor de diluição	Concentração medida (MPL U/mL)	Concentração prevista (MPL U/mL)	Recuperação %
1	1	86,5	-	(100)
	2	40,6	43,3	93,8
	4	20,7	21,6	95,8
2	1	202,8	-	(100)
	2	81,0	101,4	79,9
	4	39,9	50,7	78,7
	8	19,0	25,4	74,8
3	1	64,4	-	(100)
	2	33,5	32,2	104,0
	4	16,1	16,1	100,0

De qualquer modo torna-se necessário sublinhar que nem todos os soros, quando medidos em diluições diferentes, podem dar resultados não lineares dentro do intervalo de medição dependendo o resultado não só da concentração mas também da afinidade dos anticorpos presentes na amostra.

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit *ZENIT RA CARDIOLIPINA IgM*, expressa como **limite de detecção** (*Limit of Detection – LoD*: ou seja a menor quantidade de analito que o método é capaz de medir) foi determinada utilizando um protocolo baseado nas directrizes do documento EP17-A do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e a fórmula para o cálculo $LoD = LoB + C_{\beta} SDs$ (onde *LoB* representa o valor do “Limit of Blank”, *SDs* o desvio padrão previsto para a distribuição da amostra a baixa concentração e C_{β} deriva do percentil 95 da distribuição padrão de Gauss).

Foram utilizadas 4 amostras com baixa concentração de analito, determinadas individualmente em 15 sessões diferentes.

O Limite de detecção do kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* foi igual a 6,8 MPL U/mL.

Os valores do limite de detecção, juntamente com as considerações de carácter clínico e com os resultados de comparação com métodos de referência, contribuíram para a definição do valor de *cut-off*.

Especificidade Analítica: Interferências

Um estudo baseado nas directrizes do documento EP7-A2 do CLSI demonstrou que o desempenho do ensaio não é influenciado pela presença na amostra de substâncias potencialmente interferentes, indicadas na tabela seguinte, até à concentração testada.

Substâncias Potencialmente Interferentes	Concentração máxima testada
Bilirrubina livre	20 mg/dL
Bilirrubina conjugada	28 mg/dL
Hemoglobina	1000 mg/dL
Ácidos gordos	3000 mg/dL

Desaconselha-se o uso de amostras lipémicas, hemolisadas ou turvas.

Especificidade analítica: Reações cruzadas

Para avaliar as potenciais reações cruzadas do antígeno, utilizado para sensibilizar as partículas magnéticas, foi conduzido um estudo com 24 amostras, todas com níveis altos de outros auto-anticorpos e negativos a anti-cardiolipina IgM.

As amostras utilizadas estavam assim subdivididas: SS-A (2), SS-B (2), U1-snRNP (1), Jo-1 (2), Scl-70 (3), Cenp B (2), Histonas (2), Nucleolares (1), Gliadina/t-TG (3), CCP (1), RF (1), dsDNA (2), MPO (1), PR3 (1). O estudo não demonstrou nenhuma reação cruzada significativa do antígeno em fase sólida com os outros auto-anticorpos.

Efeito de saturação em doses elevadas

Alguns métodos imunológicos empregues para a determinação de amostras que contêm o analito em concentrações extremamente elevadas podem fornecer níveis aparentes de analito que estão subestimados em relação ao conteúdo real (Efeito hook).

O método utilizado no kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM*, sendo um método com duas incubações, não sofre esse efeito.

Uma amostra com concentração extremamente elevada (acima do intervalo de medição) de IgM anti-cardiolipina confirmou a ausência de efeito "hook" até à concentração de 593 MPL U/mL.

Sensibilidade e Especificidade Relativas

A presença de anticorpos anti-cardiolipina IgM foi determinada utilizando o kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM* e um método ELISA disponível no mercado em 245 amostras, das quais 69 amostras de doentes com a síndrome de anticorpos antifosfolípidos (APS), 46 amostras de doentes com doenças auto-imunes sistêmicas reumáticas, 30 amostras de doentes com diversas patologias infecciosas e 100 amostras de indivíduos normais.

12 amostras deram lugar a resultados divergentes entre o ensaio ZENIT RA e o método ELISA disponível no mercado

Concordância relativa: 95,1% (233/245).

Sensibilidade relativa: 92,3% (24/26).

Especificidade relativa: 95,4% (209/219).

Calibração e Preparações de referência

O sistema é calibrado contra os soros de referência "HARRIS" (Produto nº 6495GM, Lote nº 021008), reconhecidos internacionalmente.

A quantidade de anticorpos anti-cardiolipina IgM presentes no reagente de referência "Human IgM Anti-Cardiolipin Monoclonal Antibody EY2C9 20 µg/ml (CDC, Cat. nº IS2718, Lote nº 05-0058 09/20/05)", reconstituído com 0,5 mL (concentração proteica: 20 µg/mL), testada com o kit *ZENIT RA CARDIOLIPIN IgM*, deu o resultado de 300 MPL U/mL.

BIBLIOGRAFIA

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; 4:295-306.
2. Pangborn MC. A new serologically active phospholipids from beef heart. *Proc Soc Exp Biol (NY)* 1941; 48, 484-486.
3. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2, 1211-1214.
4. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJC, et al.. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335, 1544-1547.
5. McNeil HP, Simson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation : β 2-glicoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87, 4120-4127.
6. Wurm H, Beubler E, Plz E, Holasek A, Kostner G. Studies on the possible function of beta 2 – glycoprotein-I: influence in the triglyceride metabolism in the rat. *Metabolism* 1982; 31, 484-486.
7. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Interaction of beta 2-glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon the ADP-induced aggregation. *Thromb Haemost* 1985; 54, 397-401.
8. Nimpf J, Bevers EM, Boman PH, Till U, Wurm H, Kostner GM, et al.. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta 2-glycoprotein-I. *Bioch Biophys Acta* 1986; 884, 142-149.
9. Balasubramanian K, Chandra J, Schroit AJ. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta(2)-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem* 1997; 272, 31113-31117.
10. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RBG, Schouten A, Simmelink M, Derksen RHWM, Kroon J, Gros P. Adhesion mechanism of human β 2-Glicoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J* 1999; 18, 5166-5174.

11. Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassi R. Crystal structure of human β 2-glycoprotein I: implication for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. EMBO J 1999; 18, 6228-6239.
12. Hunt JU, Krilis S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys 281- Cys 288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. J Immunol 1994; 152, 653-659.
13. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K and Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet, 1990; 336, 177-178.
14. Koike T and Matsuura E. What is the "true" antigen for anticardiolipin antibodies ?. Lancet 1991; 337, 671-672.
15. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Suzuki T, Sumida T, Yasuda T and Koike T. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. J Immunol, 1992; 148, 3885-3891.
16. Viard JP, Amoura Z, and Back JF. Association of anti- β 2-glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. AM J Med, 1992; 93, 181-186.



TECHNOGENETICS S.r.l.
Viale Casiraghi 471
20099 – Sesto San Giovanni (MI) - Itália

PORTUGAL

Distribuído por

A. Menarini Diagnosticos, Lda

Quinta da Fonte - Edifício D. Manuel I, 2º B

2770-203 Paço de Arcos

Tel. +351 210 93 00 00 - Fax +351 210 93 00 01

www.menarinidiag.pt